製品コード RR064A

研究用

TaKaRa

One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)

説明書

v201406Da

One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) は、検出に TaqMan® プローブ *1 を用いる 1 ステップリアルタイム RT-PCR 専用のキットです*2。RT-PCR を 1 チューブ内で連続的に行えるため、操作が簡便でコンタミネーションの心配がありません。また、増幅産物をリアルタイムで検出でき、PCR 後に電気泳動などで確認する必要がありません。RNA ウイルスなど微量 RNA の検出に最適です。
反応には伸長性に優れ、短時間の反応で効率よく cDNA 合成が可能な PrimeScript RTase と PCR 酵素として定評のある *TaKaRa Ex Taq*® HS を用い、反応系を 1 ステップ RT-PCR 用に至適化しています。
反応特異性、増幅効率が高く、安定した 1 ステップリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System（Cepheid 社）
- Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System（Life Technologies）
- LightCycler（Roche Diagnostics 社）など

＊1：TaqMan は、Roche Diagnostics 社の登録商標です。
The 5' nuclease process is covered by patents owned by Roche Diagnostics Inc、and F. Hoffmann-La Roche Ltd. Purchase of the product does not provide a license to use this patented technology.

＊2：SYBR® Green I を用いる 1 ステップリアルタイム RT-PCR には、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR096A/B）、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR066A/B）、または One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)（製品コード RR086A/B）などをご使用ください。

I. 原理

One Step PrimeScript RT-PCR Kit(Perfect Real Time) では、逆転写酵素 PrimeScript RTase による RNA からの cDNA 合成と *TaKaRa Ex Taq* HS による PCR 増幅を 1 チューブ内で連続的に行います。PCR 増幅産物は、TaqMan プローブによりリアルタイムでモニタリングします。

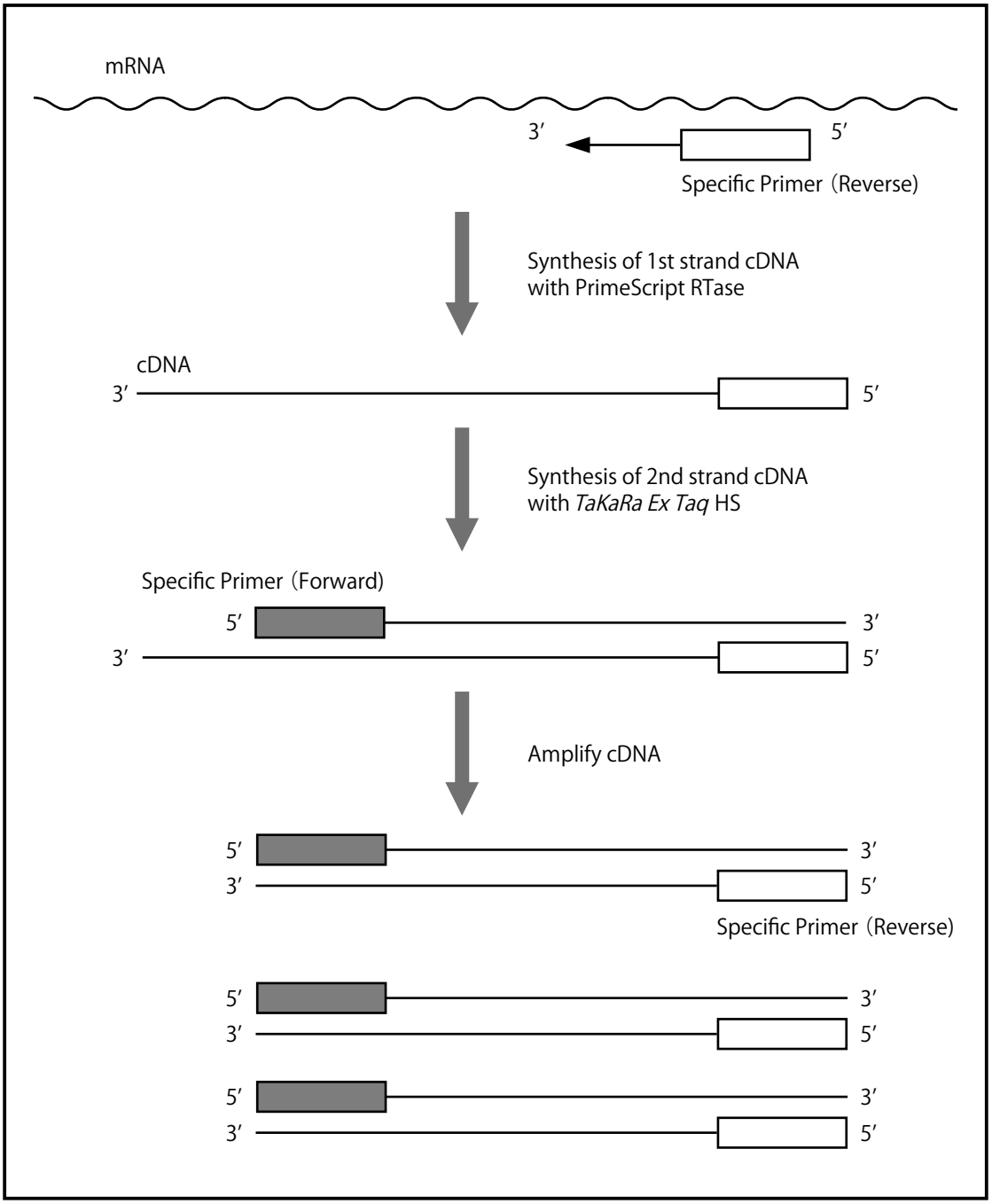
1. PCR

PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることができます。
本製品では、増幅に Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. RT-PCR

RNA は PCR 法の直接の鋳型とはなりませんが、逆転写酵素により RNA から cDNA を合成することにより、PCR 法を RNA 解析に応用することが可能になります。これが RT-PCR 法であり、高感度な RNA 検出方法です。
本製品では、One Step RT-PCR を行います。その原理を次ページに示します。

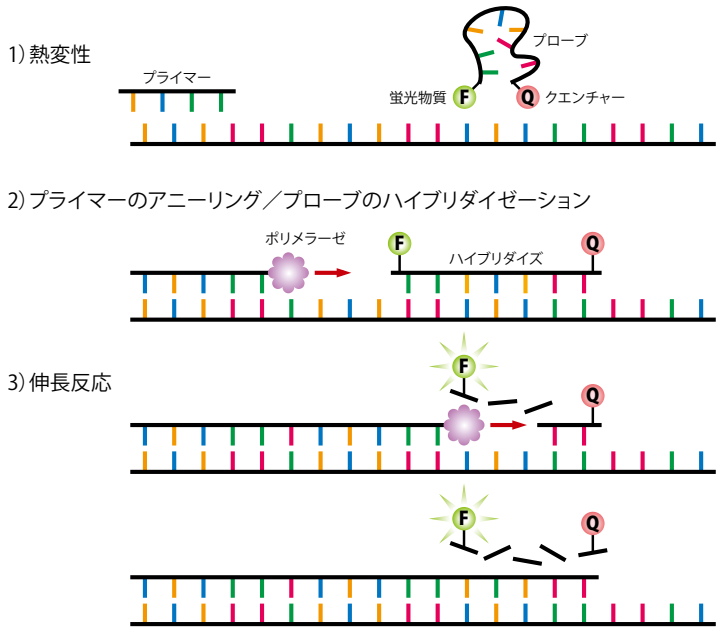
One Step RT-PCR では、PCR 用の Specific Primer（Reverse）を用いて逆転写反応を行い、合成された cDNA を鋳型として Specific Primer（Forward、Reverse）による PCR 増幅を行います。（Random Primer および Oligo dT Primer を逆転写反応に用いることはできません。）



1 ステップ RT-PCR 法の原理

3. 蛍光検出

TaqMan プローブ法：
5′ 側を蛍光物質（FAM など）で、3′ 側をクエンチャー物質（TAMRA など）で修飾したオリゴヌクレオチドを反応系に加えます。
アニール条件下では、TaqMan プローブはテンプレート DNA に特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、*Taq* DNA ポリメラーゼの持つ 5′ → 3′ exonuclease 活性により、テンプレートにハイブリダイズした TaqMan プローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで発する蛍光を検出する方法です。



II. キットの内容（100 回；50 μl 反応系）

1.	2 × One Step RT-PCR Buffer III＊1	840 μl ×3
2.	*TaKaRa Ex Taq* HS（5 U/μl）	100 μl
3.	PrimeScript RT enzyme Mix II＊2	100 μl
4.	RNase Free dH_2O	1.25 ml ×2
5.	ROX Reference Dye（50×conc.）＊3	100 μl
6.	ROX Reference Dye II（50×conc.）＊3	100 μl

＊1： dNTP Mixture、Mg^{2+}を含む。

＊2： RNase Inhibitor を含む。

＊3： Life Technologies のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye を添加する機種
- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System（Life Technologies）

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種
- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System（Life Technologies）

◆ 添加の必要がない機種
- Thermal Cycler Dice Real Time System *II*
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*
- Smart Cycler System（Cepheid 社）
- LightCycler（Roche Diagnostics 社）

キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー
4. 検出用 TaqMan プローブ（licensed probe）
5. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

III. 保存

－ 20℃

IV. 特長

1. One Step RT-PCR により RNA ウイルスなど微量 RNA の解析を迅速かつ正確に行うことが可能です。

2. PCR には、Hot Start 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を用いています。バッファー系は、リアルタイム PCR 用に至適化されているため、増幅効率が良く、高感度な検出ができます。また、バッファーは、2 ×濃度のプレミックスなので、反応液の調製が簡単です。

V. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。**使用前に必ずお読みください。**

1. 反応液は、数回～10回分程度をまとめて Master Mix（RNase Free dH_2O、バッファー、酵素等の混液）を調製すると便利です。Master Mix を作ることにより、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、撹拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。

2. *TaKaRa Ex Taq* HS、PrimeScript RT enzyme Mix II は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50%グリセロール溶液で粘度が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。これらの酵素類は使用直前まで－ 20℃で保存し、使用後は直ちに－ 20℃に保存してください。

3. 2 × One Step RT-PCR Buffer III は、融解時に不溶物が見られる場合がありますが、溶解すれば問題ありません。Vortex 等を使用して、完全に溶解してから使用してください。

4. 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

5. 本キットによる逆転写反応には、特異的なプライマーを用います。Random Primer や Oligo dT Primer は使用できません。

VI. 操作

※ 各機種の取扱説明書に従って操作してください。
（RNA 調製方法は、「VIII. RNA サンプルの調製について」をご参照ください。）

＜ Thermal Cycler Dice Real Time System *II* および *Lite* を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step RT-PCR Buffer III	12.5 μl	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS（5 U/μl）	0.5 μl	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.5 μl	
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	1 μl ＊2	
total RNA	2 μl ＊3	
RNase Free dH_2O	7.5 μl	
Total	25 μl	

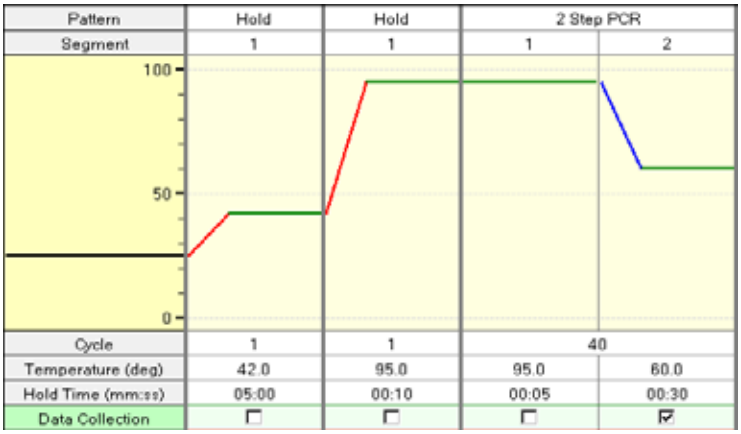
＊ 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。プローブの添付データシート等を参考に添加量を検討する。Thermal Cycler Dice Real Time System の場合、通常、最終濃度 0.1 ～ 0.5 μM の範囲で検討する。

＊ 3： total RNA 10 pg ～ 100 ng を template として使用することが望ましい。

2. 反応チューブまたはプレートを遠心機で軽く遠心後、Thermal Cycler Dice Real Time System にセットし、反応を開始する。

   反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（12 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）



Pattern 1：逆転写反応
　Hold
　42℃　5 分
　95℃　10 秒
Pattern 2：PCR 反応
　Cycle：40
　95℃　5 秒
　60℃　30 秒

※ 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 〜）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95℃ 10 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

   解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System 取扱説明書と VII. 実験例をご参照ください。

＜ Smart Cycler II System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す反応液を 氷上で調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step RT-PCR Buffer III	12.5 μl	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS（5 U/μl）	0.5 μl	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.5 μl	
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	1 μl ＊2	
total RNA	2 μl ＊3	
RNase Free dH_2O	7.5 μl	
Total	25 μl	

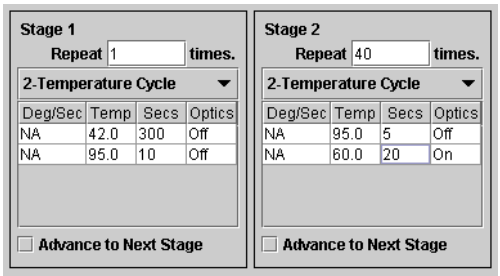
＊ 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。プローブの添付データシート等を参考に添加量を検討する。Smart Cycler II System の場合、通常、最終濃度 0.1 ～ 0.5 μM の範囲で検討する。

＊ 3： total RNA 10 pg ～ 100 ng を template として使用することが望ましい。

2. 反応チューブを Smart Cycler 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler にセットし、反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（12 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）



Stage 1：逆転写反応
　Hold
　42℃　5 分
　95℃　10 秒
Stage 2：PCR 反応
　Repeat：40
　95℃　5 秒
　60℃　20 秒

※ 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95℃ 10 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Smart Cycler System 取扱説明書をご参照ください。

＜ LightCycler を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step RT-PCR Buffer III	10 μl	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS（5 U/μl）	0.4 μl	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 μl	
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl ＊2	
total RNA	2 μl ＊3	
RNase Free dH_2O	5.6 μl	
Total	20 μl	

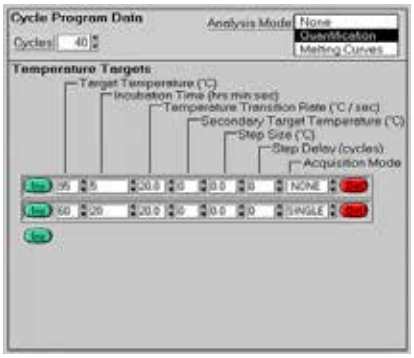
＊ 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2： プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊ 3： total RNA 10 pg ～ 100 ng を template として使用することが望ましい。

2. PCR キャピラリーを遠心機で軽く遠心後、LightCycler にセットし、反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（12 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）



Stage 2：PCR 反応

Stage 1：逆転写反応
42℃　5 分　20℃／秒
95℃　10 秒　20℃／秒
1 サイクル

Stage 2：PCR 反応
95℃　5 秒　20℃／秒
60℃　20 秒　20℃／秒
40 サイクル

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95℃ 10 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、LightCycler の取扱説明書をご参照ください。

＜ Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法＞

1. 下記に示す反応液を 氷上で調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	使用量	最終濃度
2 × One Step RT-PCR Buffer III	10 μl	25 μl	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS（5 U/μl）	0.4 μl	1 μl	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 μl	1 μl	
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl	2 μl ＊2	
ROX Reference Dye or Dye II（50×）＊3	0.4 μl	1 μl	
total RNA	2 μl	4 μl ＊4	
RNase Free dH_2O	5.2 μl	14 μl	
Total	20 μl ＊5	50 μl ＊5	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

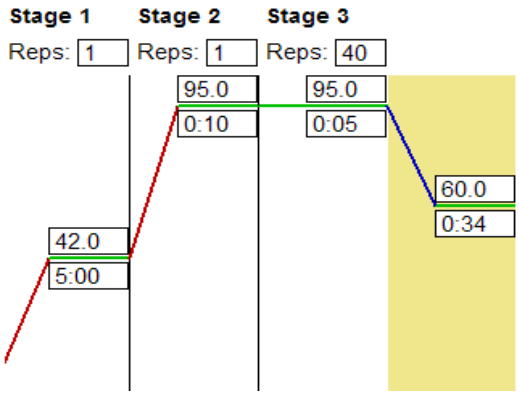
＊ 3：ROX Reference Dye II（50×）は、ROX Reference Dye（50×）より濃度が低く設定されている。Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II（50×）を使用する。
Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System には、ROX Reference Dye（50 ×）を使用する。

＊ 4：50 μl 反応液あたり total RNA 20 pg ～ 200 ng を template として使用することが望ましい。

＊ 5：各装置の推奨容量に従って調製する。

2. 反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（12 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）



Stage 1、2：逆転写反応
　Reps：1
　42℃　5 分
　95℃　10 秒
Stage 3：PCR 反応
　Reps：40
　95℃　5 秒
　60℃　31 or 34 秒＊

＊：7300 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定する。

※ 使用上の注意
本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 Taq 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95℃ 10 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

＜ PCR 反応条件について ＞

シャトル PCR　　サイクル数：30 ～ 45 サイクル

ステップ	温度	時間	検出	コメント
変性	95℃	3 ～ 5 秒	OFF	リアルタイム PCR の増幅サイズは一般的に 300 bp 以下なので、95℃で 3 ～ 5 秒程度でよい。
アニーリング／伸長	56 ～ 64℃	20 ～ 30 秒（31秒、34秒）＊	ON	まずは、説明書に記載した各装置での推奨条件を試す。反応条件の至適化を行う場合には、56 ～ 64℃の範囲で検討する。反応性が悪いときは、このステップの時間を延ばすと改善する場合がある。

＊：Life Technologies の装置では、検出ステップを 30 秒以内に設定できない機種があります。7300 は 31 秒以上に、7500 は 34 秒以上に設定します。

VII. 実験例

Mouse Actb の検出

（Thermal Cycler Dice Real Time System を使用）

1. 方法

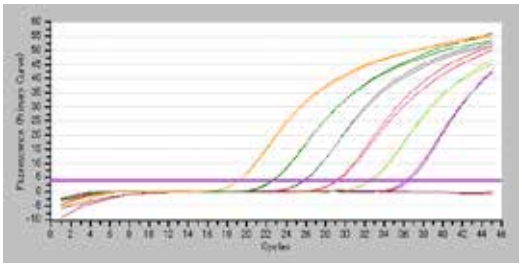
Mouse Liver から調製した total RNA 1 pg ～ 100 ng を鋳型として、1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応により、Mouse Actb の検出を行った。検出には、TaqMan Gene Expression Assays（Life Technologies）のプライマーと TaqMan プローブを用いた。

2. 結果

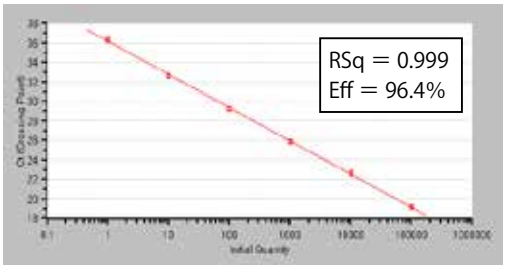
PCR 増幅産物のリアルタイムモニタリング

Crossing Point 法（CP 法）

増幅曲線

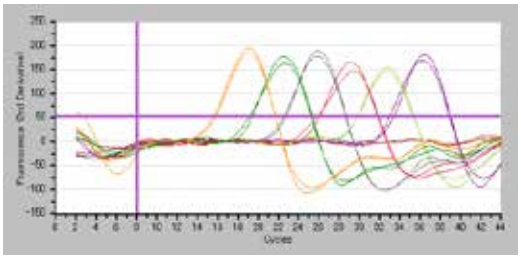


検量線

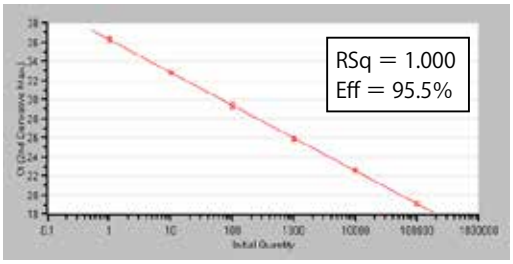


2nd Derivative Maximum 法（SDM 法）

増幅曲線



検量線



3. 考察

total RNA 1 pg ～ 100 ng で目的遺伝子を検出できました。作成した検量線の直線性は高く、実験した濃度範囲で正確な定量が可能だと考えられます。

VIII. Appendix：RNA サンプルの調製について

本キットは RNA から cDNA 合成、PCR 増幅を行うキットです。cDNA 合成を成功させるためには純度の高い RNA サンプルを得ることが大切です。そのためには、細胞内に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

【器具】

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。一般のガラス器具は以下の処理の 1. あるいは 2. を行ってから使用してください。

1. 乾熱滅菌（180℃、60 分）
2. ガラス器具を 0.1%ジエチルピロカーボネート（DEPC）溶液で、37℃、12 時間処理する。残留 DEPC を除去するためにオートクレーブ処理（120℃、30 分）する。

RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

【溶液】

実験に用いる試薬溶液は、上記の条件で乾熱滅菌（180℃、60 分）あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、用いる蒸留水はあらかじめ 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしてください。用いる溶液、蒸留水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

【RNA サンプルの調製法】

RT-PCR 法に用いる RNA サンプルは、通常少量の RNA があればよい場合が多いので簡便な精製法が用いられることもありますが、できれば高純度に精製した RNA を使用することをお勧めします。
培養細胞や組織サンプルからの高純度 total RNA の調製には、スピンカラムタイプの NucleoSpin RNA（製品コード 740955.10/.50/.250）や AGPC 法の簡便化試薬である RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）が便利です。

IX. 関連製品

Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)（製品コード RR390A/B）
One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR066A/B）
One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)（製品コード RR086A/B）
One Step SYBR® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR096A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420S/A/B）
SYBR® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time)（製品コード RR091A/B）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Smart Cycler II System（製品コード SC200N/SC210N）
NucleoSpin RNA（製品コード 740955.10/.50/.250）
RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）

X. 参考文献

1）吉崎美和、向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」、第 3 章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ、120 - 126

2）吉崎美和、向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析、39 - 43

XI. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- *TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Molecular Probes, Inc. の、TaqMan は Roche Diagnostics GmbH の登録商標です。PrimeScript、*Premix Ex Taq*、DimerEraser はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201406Da